



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Off nl gungsschrift
⑩ DE 195 23 279 A 1

⑳ Aktenzeichen: 195 23 279.8
㉑ Anmeldetag: 27. 6. 95
㉒ Offenlegungstag: 9. 1. 97

⑤ Int. Cl. 8:
C 12 N 15/63
C 12 N 15/77
C 12 N 15/31
C 12 N 1/00
C 12 N 1/21
C 12 P 13/04
C 07 C 229/00
C 07 C 229/34
// (C12N 15/77, C12R
1:15) (C12N 15/31,
C12R 1:15) (C12N
1/21, C12R 1:15)
(C12P 13/04, C12R
1:15) C07C 229/36

DE 195 23 279 A 1

㉗ Anmelder:
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, DE

㉘ Erfinder:
Wehrmann, Axel, 52428 Jülich, DE; Eggeling, Lothar,
Dr., 52428 Jülich, DE; Krämer, Reinhard, Prof., 52428
Jülich, DE

㉙ Entgegenhaltungen:
EP 3 31 145 A2

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉚ Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren mittels rekombinanter Mikroorganismen mit erhöhter Sekretionsrate

㉛ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem ein für ein Protein zur Aufnahme einer Aminosäure kodierendes Transportgen aus einem Mikroorganismen-Stamm isoliert, kloniert und in eine, die entsprechende Aminosäure produzierende Wirtszelle transformiert wird, wonach nach Expression des Transportgens die Sekretionsrate der Aminosäure erhöht ist und die Wirtszelle einen erhöhten Anteil an Aminosäure ins Medium ausscheidet, sowie einen Genstruktur enthaltenden Vektor und eine transformierte Zelle, die die Genstruktur enthält. Es wurde gefunden, daß die Sekretionsrate der Aminosäure pro Zeiteinheit erhöht ist. Außerdem scheiden derart transformierte Wirtszellen einen erhöhten Anteil der entsprechenden Aminosäure ins Kulturmedium aus.

DE 195 23 279 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNESDRUCKEREI 11. 96 602 062/89

8/31

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren gemäß den Ansprüchen 1 bis 7, ein Transportgen nach Anspruch 8, Vektoren nach Anspruch 9 und 10 sowie transformierte Zellen nach den Ansprüchen 11 bis 15.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, w bei der Bedarf an Aminosäuren weiterhin zunimmt. So wird beispielsweise L-Tryptophan als Medikament und als Zusatz zu Futtermitteln benötigt; für L-Tyrosin besteht ebenfalls Bedarf als Medikament sowie als Rohstoff in der pharmazeutischen Industrie. L-Phenylalanin wird insbesondere zur Herstellung des Süßstoffes Aspartam benötigt. Neben der Isolierung aus natürlichen Materialien ist die biotechnologische Herstellung die einzige Methode, um Aminosäuren in der gewünschten optisch aktiven Form unter wirtschaftlich vertretbaren Bedingungen zu erhalten. Die biotechnologische Herstellung erfolgt entweder enzymatisch oder durch mikrobielle Fermentation.

Die mikrobielle Herstellung hat den Vorteil, daß einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden können. Da die Biosynthese der Aminosäuren in der Zelle aber in vielfacher Weise kontrolliert wird, sind bereits vielfältige Versuche zur Steigerung der Produktbildung unternommen worden. So wurden z. B. Aminosäure-Analoga eingesetzt, um die Regulation der Biosynthese auszuschalten. Beispielsweise ist ein Verfahren beschrieben, bei dem Corynebacterium-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalanin-Analoga resistent sind (Jap. Patent Application Nr. 19037/1976 und Nr. 39517/1978). Ebenso ist ein Prozeß beschrieben, bei dem gegen das L-Tryptophan-Analogon 5-Methyltryptophan resistente Mikroorganismen eingesetzt werden.

Des weiteren sind durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feed-back inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z. B. ein rekombinantes, L-Tyrosin produzierendes Bakterium mit plasmidkodierter, feed-back resistenter 3-Desoxy-D-arabino-hepturonsäure-7-phosphat synthase und feed-back resistenter Chorismatmutase beschrieben (Jap. Patent Application Nr. 34197/1985). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feed-back resistenter Prephenatdehydrogenase bekannt (Jap. Patent Application Nr. 124375/1986, European Patent Application Nr. 0 488 424).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine verbesserte Bereitstellung der zellulären Primärmetabolite des Zentralstoffwechsels. So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin oder L-Phenylalanin ermöglicht (European Patent Application Nr. 0 600 463). Weiterhin führt die Reduktion der Phosphoenolpyruvatcarboxylase-Aktivität in Corynebacterium zur verbesserten Bildung aromatischer Aminosäuren (European Patent Application Nr. 0 331 145).

Diese vielfältigen Versuche zur Produktivitätssteigerung sind insgesamt darauf gerichtet, die Limitation der cytosolischen Synthese der Aminosäuren zu überwinden. Als eine weitere Limitation kommt grundsätzlich aber auch der Export der im Zellinneren gebildeten Aminosäuren ins Kulturmedium in Betracht. Daher gibt es bereits Ansätze, diesen Export und damit die Wirtschaftlichkeit der Aminosäureproduktion zu verbessern. So hat man die Zellpermeabilität bei Corynebacterium durch Biotinmangel, Detergenz- oder Penicillinbehandlung erhöht. Diese Ausschleusehilfen waren jedoch ausschließlich bei der Glutamatproduktion erfolgreich, während die Synthese anderer Aminosäuren auf diese Weise nicht verbessert werden konnte. Andererseits sind aber auch bereits Bakterienstämme entwickelt worden, bei denen die Aktivität des Sekretionssystems aufgrund chemischer oder physikalischer Mutation erhöht ist. Es wurde dadurch beispielsweise ein Corynebacterium glutamicum-Stamm erhalten, der sich durch eine verbesserte Sekretionsaktivität insbesondere für die L-Lysinproduktion eignet (Deutsche Patentschrift Nr. 42 03 320).

Die biochemischen Grundlagen zum Export von Aminosäuren sind bisher nur zum Teil verstanden (FEMS Microbiol. Rev. (1994) 13: 75—79); insbesondere konnten noch keine, für Aminosäure-Exportproteine kodierenden Gene für rekombinante-Techniken zur Verbesserung des Aminosäure-Exports bereitgestellt werden. Demgegenüber sind Gene, die die Aufnahme von Aminosäuren aus dem Kulturmedium ins Zellinnere vermitteln, gut bekannt (Arch. Microbiol. (1994) 162: 1—13). Beispielsweise wird bei Corynebacterium die Glutamataufnahme durch das gluABCD kodierte, primär aktive System katalysiert (J. Bacteriol. (1995) 177: 1152—1158) und die Lysinaufnahme durch das lysI-Protein (Mol. Microbiol. (1991) 5: 2995—3005). Auch ist ein DNA-Fragment beschrieben, das die Aufnahme der aromatischen Aminosäuren vermittelt (J. Ferment. Bioeng. (1994) 78: 420—425).

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das es erlaubt, die Sekretion zellintern gebildeter Aminosäuren gezielt zu erhöhen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Transportgen, das für ein Protein zur Aufnahme einer Aminosäure kodiert, aus einem Mikroorganismen-Stamm isoliert, kloniert und anschließend in eine Wirtszelle, die die entsprechende Aminosäure produziert, transformiert wird. Es wurde überraschenderweise gefunden, daß bei solchen Transformanden die Sekretionsrate, d. h. der Export der Aminosäure pro Zeiteinheit, erhöht ist, obwohl das klonierte und transformierte Transportgen nicht für den Export, sondern für die Aufnahme der entsprechenden Aminosäure verantwortlich ist. Auch scheiden derart transformierte Wirtszellen einen erhöhten Anteil der entsprechenden Aminosäure ins Kulturmedium aus.

Die Isolierung, Klonierung und Transformation des entsprechenden Transportgens erfolgt nach gängigen Methoden: Im Falle der Klonierung eines Transportgens aus Corynebacterium eignet sich beispielsweise die Methode der homologen Komplementation oder auch der heterologen Komplementation von aufnahmefähigen Escherichia coli-Mutanten. Vorzugsweise gelangen Vektoren mit niedriger Kopienzahl zum Einsatz, da eine Überexpression von Transportgenen toxisch sein kann (P. Natl. Acad. Sci., USA (1979) 76: 4360—4364). Falls

keine direkte Klonierung des Strukturgens möglich ist, kann zunächst auch die Insertion von Vektorsequenzen in das Transportgen erfolgen, um es dann über "plasmid-rescue" in *Firm* inaktiver Fragmente zu isolieren. Ferner sind eine Vielzahl von Sequenzen bekannt, die für Membranproteine unbekannter Funktion kodieren, so daß zunächst das Transportgen durch funktionelle Analyse zu identifizieren ist, um es dann zur Verbesserung der Aminosäureproduktion einzusetzen.

Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus *Corynebacterium*, z. B. *C. glutamicum* ATCC 13032 oder *C. glutamicum* ssp. *flavum* DSM 2041 oder auch *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* DSM 2042. Für die Herstellung von aromatischen Aminosäuren nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eignet sich insbesondere das aus *C. glutamicum* ATCC 13032 isolierte Gen für die Aufnahme aromatischer Aminosäuren mit der Gensequenz gemäß Tabelle 1.

Nach Isolierung der Gene und deren in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren, wie z. B. pEK0, pEC5, pJC1, pWST1, erfolgt die Transformation der die entsprechende Aminosäure produzierenden Wirtszelle durch Elektroporation (FEMS Microbiol. Lett. (1989) 65: 299–304) oder Konjugation (J. Bacteriol. (1990) 172: 1663–1666). Als Wirtszellen werden bevorzugt solche Aminosäure-produzierenden Stämme, insbesondere aus der Gattung *Corynebacterium*, eingesetzt, in denen die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind und/oder die einen erhöhten Anteil an Zentralstoffwechselmetaboliten bereitstellen.

Ausführungsbeispiel

a) Klonierung eines Transportgens

Plasmid pJcdapEBamHI-3.4 (Microbiology, UK (1994) 140: 3349–3356) enthält chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC13032. Nach Anzucht in LB bei 37°C wurde dieses Plasmid aus *E. coli* DH5 mittels alkalischer Lyse isoliert (Sambrook et al., Molecular Cloning, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und BstI nach Angaben des Herstellers geschnitten, und das resultierende 276 bp große DNA Fragment (orf5int1, Fig. 1) mit dem in *C. glutamicum* nicht replizierenden Plasmid pEM1 (J. Bacteriol. (1991) 173: 4510–4516) ligiert. Das resultierende Plasmid pEMorf5int1 wurde durch Konjugation nach *C. glutamicum* ATCC13032 übertragen (J. Bacteriol. (1990) 172: 1663–1666), wodurch der neue Stamm *C. glutamicum*::orf5int1, mit dem im Chromosom inaktivierten Genort ORF5, entstand. *C. glutamicum*::orf5int1 wurde über Nacht auf LB Medium bei 30°C angezogen, die Zellen aus 60 ml wurden durch Abzentrifugation geerntet, und mittels alkalischer Lyse, nach Vorinkubation mit 0,5 ml Lysozym (20 mg Lysozym/10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) wurde die chromosomale DNA dieses Stammes isoliert. Diese DNA wurde mit HindIII restringiert, ligiert mit T4-Ligase, und benutzt um *E. coli* DH5 damit zu transformieren, wobei auf pEM1 eigene Kanamycinresistenz selektioniert wurde. Die erhaltenen Klone wurden durch Hybridisierung und Restriktion analysiert, und so schließlich Plasmid pUCorf5c3.9 (Fig. 1) erhalten. Von diesem Plasmid wurde orf5c1.4 zusammen mit orf5n1.6 in pJC1 ligiert, so daß Plasmid pJCorf5 entstand. Dieses Plasmid wurde durch Elektroporation nach *C. glutamicum* ATCC13032 transferiert. Zusätzlich zu *C. glutamicum*::orf5int1, wurde *C. glutamicum*::orf5int2 konstruiert, indem pJCorf5 mit dem Restriktionsenzym ScaI behandelt wurde, und das resultierende 609 bp große Fragment zusammen mit SalI-geschnittenen und mit Klenow-Polymerase behandeltem Plasmid pEM1 ligiert wurde. Durch Konjugation wurde so der Stamm *C. glutamicum*::orf5int2 hergestellt.

b) Identifizierung eines Transportgens

Die drei Stämme *C. glutamicum* pJCorf5, *C. glutamicum*::orf5int2, und der Wildtyp von *C. glutamicum* wurden über Nacht auf BHI Komplexmedium (Difco 0502-08-5B) bei 30°C angezogen. Sie wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet, mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 gewaschen, und in Minimalmedium CGXII (J. Bacteriol. (1993) 175: 5595–5603) ohne Stickstoffquelle, aber mit 4% Glukose übertragen. Nach drei Stunden Inkubation bei 30°C wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation geerntet, mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 gewaschen, und in Minimalmedium CGXII wiederum ohne Stickstoffquelle mit 4% Glukose übertragen. Davon wurden 9 Kolben hergestellt. Je drei der Kolben enthielten zusätzlich L-Alanin, Aminobuttersäure, L-Arginin, L-Asparagin, L-Aspartat, oder L-Aspartat, L-Glutamat, L-Glutamin, L-Glycin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, oder L-Lysin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Serin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Valin (alle Aminosäuren jeweils 1 mM). In je einen Satz der Kolben wurde einer der drei Stämme übertragen. Die Kolben wurden bei 30°C inkubiert, und nach 24 Stunden die verbliebenen Aminosäuren mittels Hochdruckflüssigchromatographie nach Vorsäulenderivatisierung durch ortho-Phthaldehyd (J. Chromatograph. (1983) 266: 471–482) quantifiziert. L-Leucin, L-Threonin, L-Alanin, Aminobuttersäure, L-Asparagin, L-Aspartat, L-Glutamat, L-Glutamin, L-Serin, und L-Isoleucin waren durch den Wildtyp von *C. glutamicum* vollständig verbraucht, L-Valin, L-Arginin, L-Histidin, L-Methionin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Threonin, und L-Tryptophan zu etwa 50%, L-Glycin, L-Arginin, L-Lysin zu etwa 20%. Große Unterschiede bei der Aufnahme von L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Tryptophan, und L-Histidin zeigten sich zwischen den drei Stämmen. Die Aufnahme wurde deswegen mit der identischen Verfahrensweise für die drei Stämme, aber jeweils eine der drei aromatischen Aminosäuren allein verfolgt. Wie aus Fig. 2 hervorgeht, erfolgt durch *C. glutamicum* pJCorf5 eine verstärkte Aufnahme der drei aromatischen Aminosäuren gegenüber *C. glutamicum*. Damit ist ORF5 als das aromatische Aminosäureaufnahme-Gen von *C. glutamicum* identifiziert. Entsprechend zeigt die Insertionsmutante *C. glutamicum*::orf5int2 eine verringerte Aufnahme von L-Tyrosin und L-Tryptophan.

c) Erhöhte Produktbildung durch das Transportgen

Der Wildtyp von *C. glutamicum* und *C. glutamicum* pJCorf5, wurde über Nacht auf BHI Komplexmedium bei 30°C angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 gewaschen, und damit, mit einer Anfangs OD von 10 (am Zeiss Spektralphotometer PM6) das Minimalmedium CGXII ohne Stickstoffquelle, aber 4% Glukose und 1 mM Dipeptid Tyr-Phe enthaltend, beimpft. Zum Zeitpunkt 0, und nach ein und 2 Stunden Inkubation bei 30°C wurden Proben zur Dipeptid und Aminosäureanalyse entnommen. Diese wurden wiederum mittels Hochdruckflüssigchromatographie nach Versäulenderivatisierung durch ortho-Phthaldehyd quantifiziert. Bereits nach einer Stunde war alles Dipeptid, wegen der bekannten effizienten Peptidaufnahmesysteme im Medium verschwunden (J. Gen. Microbiol. (1993) 139: 3115–3122). Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, war aber die externe Akkumulation von L-Tyrosin stark verbessert.

Tabelle 2

Externe Akkumulation von L-Tyrosin nach Aufnahme von 1 mM Tyr-Phe bei *C. glutamicum* pJCorf5, und dem Wildtyp von *C. glutamicum*.

Stamm	L-Tyrosin (mM)		
	0 (h)	1 (h)	2 (h)
<i>C. glutamicum</i> pJCorf5	0.059	0.276	0.424
<i>C. glutamicum</i>	0.073	0.133	0.253

d) Erhöhte Exportrate durch das Transportgen

Die zwei Stämme *C. glutamicum* pJCorf5 und *C. glutamicum* wurden auf BHI Komplexmedium angezogen, mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 gewaschen, und damit das Minimalmedium CGXII (J. Bacteriol. (1993) 175: 5595–5603) ohne Stickstoffquelle, aber 4% Glukose und 1 mM Dipeptid Tyr-Phe enthaltend, beimpft. Direkt nach dem Beimpfen, und in Abständen von 5 bis 10 Minuten wurden Aliquots von 200 µl entnommen, die in Beckmann Zentrifugenvials gegeben wurden, die 30 µl 20% HClO₄ und 65 µl Silikonöl der Dichte 1,04 enthielten, und direkt in der Beckmann Zentrifuge für 125 Minuten zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Beckmann vials wie beschrieben (Methods Enzymology (1967) 10: 680–684) zur Quantifizierung der cytosolischen und der externen Aminosäurekonzentrationen aufgearbeitet. Wie Fig. 3 zeigt, erfolgt durch das beschriebene Verfahren mit Hilfe des Transportgens bei *C. glutamicum* pJCorf5 eine wesentlich höhere Exportrate von L-Tyrosin als beim Ausgangsstamm, so daß es zu einer erhöhten Akkumulation kommt. Die Exportrate ist bei *C. glutamicum* pJCorf5 trotz der gleichzeitig bedingten niedrigeren cytosolischer L-Tyrosinkonzentration erhöht, was die Effizienz des Transportgens zur verbesserten Aminosäureproduktion durch das Aufnahmegene belegt.

Die Fig. 1 bis 3 zeigen im einzelnen:

Fig. 1: Übersicht über den *dapE*, *aroP* locus von *Corynebacterium glutamicum*. Der Ausgangsklon um ORF5 zu isolieren ist in der Abbildung oben gezeigt. Anhand der erstellten Sequenz wurde schließlich das chromosomale 3.9 kb HindIII-EcoRI Fragment (*orf5c3.9*) isoliert. Durch funktionelle Studien mit rekonstituiertem und Plasmid-codiertem ORF5 wurde dieser ORF als Gen *aroP* von *C. glutamicum* identifiziert, das das allgemeine Aufnahmesystem für aromatische Aminosäuren codiert. Ausgewählte Restriktionsschnittstellen des Chromosoms, und solche die für die jeweiligen Konstruktionen zur Klonierung und funktionellen Identifizierung wichtig waren sind angegeben. Die Abkürzungen sind: B, BamHI; Bg, BglII; Bs, BstEI; E, EcoRV; H, HindIII; Sa, Sall; Sc, SacI; X, XhoI.

Fig. 2: Identifikation von *aroP* durch direkten Nachweis der Aufnahme aromatischer Aminosäuren durch den Wildtyp von *C. glutamicum* (■), sowie die *aroP*-Defektmutante (▽), und den Stamm *C. glutamicum* *paroP* (▲) mit plasmidcodiertem, überexprimiertem *aroP*.

Fig. 3: Erhöhte Tyrosinsekretion durch den *aroP*-Überexprimierer (■) im Vergleich zur *aroP*-Defektmutante (▲). Die ebenfalls angegebenen cytosolischen Tyrosinkonzentrationen zeigen zusätzlich die verstärkte Exportaktivität des *aroP*-Überexprimierers an.

Tabelle 1

CGGCTCCATGACCCAGTTGCCCGCCTCAAAGCTTGACCCATTTCATATACCAAGTGCATGGCTTACGGTGTACGGTGTAAATCTAAATGAAGG 100
G F H E P V A R L K A arop M A K S N E G

CTGGNACCGGACTTCGGACCCGACCTCAACAATGATGGGACTCGGCTCGCAATTTGGTCCGGACTGTCTCCGGACCGGGTGGTATCCGCGCAG 200
L G T G L R T R H L T M M G L G S A I G A G L F L G T G V G I R A

CCGGCCCCGAGTCTCTGGCGTACATCATCGCCGGAGCCATCGTTGTGCTTATGCAATGCTGGGAGATGCTGCTGCCGTCCCGCTCCG 300
A G P A V L L A Y I I A G A I V V L V M Q M L G E M A A A A R P A S G

ATCGTTTCACGTTACGGGAGGATGCTTCGGCCACTGGCTGTCTCCCTCGGTTGTACTGCTCATGCTGATTTATGGTCATGGCGCGAA 400
S F S R Y G E D A F G H W A G F S L G W L Y W F M L I M V M G A E

ATGCTGGCGTCTGCCATCATGGTGCATGGTTCGGGTGCAACGCTGGATCTTCGCTGTCTCGTGTCTTCGCTGTGGTGAACCTGTCTG 500
M T G A A A I M G A N F G V E P N I P S L V C V V F F A V V N L V

CGTTCGCGGTTCGGTGAATTCGAGTACTGTTCCGATCATTTAAGTCCGGTGATCATCGCTTCCTCATCATTTGGTATTGCTCTATTTTCGUA 600
A V R G F G E F E Y W F A F I K V A V I I A F L I I G I A L I F G W

GCCTCCGGGATCACCTTTGTTGGAACCTCAACTTCATCGGTGATCAGGATTCATGCCCATGGTATTCTCTGGTGTCTGCTGGTTGCTCGCGTG 700
L P G S T F V G T S N F I G D H G F M P N G I S G V A A G L L A V

GCTTTGCTTTGGTGGCATGAAATGTCAACATTCGAGCTCGAGATCCGATANGCCACGTGAAGCTATTCCCTGGCGGTGCGTCCGTTGCTG 800
A F A F G G I E I V T I A A A E S D K P R E A I S L A V R A V I W

GTATTTCAGCTTTTACCTGGGCTCTGTTTGGTCAATCATCTTCCTCATGCTTANGTCAATGGTCCGACACGCTCGGAAATCCCCCTTCAC 900
R I S V F Y L G S V L V I T F L M P Y E S I N G A D T A A E S P I T

CCAAATCCTGGCATGGCAACATCCCTGGACGGTGGTTTCATGGAAGCATCATCGTTCTAGCACATGCTTCGGTTTCAACGCCCAATCATANGCC 1000
Q I L A M A N I P G T V G F M E A I I V L A L L S A F N A Q I Y A

ACTTCGTTTGGTATTTCCATGGGAATCGACAGGCTCCGGAGTTTTCAGTAAGCTCAGCACCGCACCGTCCCCACCAATGGGCTGTGT 1100
T S R L V F S M A N R Q D A P R V F S K L S T S H V P T N A V L L

CCATGTTCTTCGCTTCAGTTGGTTTCAGTACTGGAATCCAGCGGTCTGCTTGATTCCTCCTCAACGCTGTGGCGGTTGTTGATTTGGT 1200
S M F F A F V S V G L Q Y W N P A G L L D F L L N A V G G C L I V V

GTGGCAATGATCACTTTGTCACAGTTGAATCCGCAAGAACTGCAAGCAACGATGAATCTCAGGTTGCGATGTGGCGCACCCATGGTTAGGC 1300
W A M I T L S Q L K L R K E L Q A N D E I S T V R M W A H P W L G

ATCCTCACCTTGTTTGGCAGGACTCGTTGCTCATGCTCGCGACGACGCTCCGAGCCAGGTTTACTCAGTGGCAATTTGTACGGATCT 1400
I L T L V L L A G L V A L M L G D A A S R S Q V Y S V A I V Y G F

TGTTCTTTTGTCTTCACAGTCAAGCCCATTCGGCGGAGTGGCACCCCTTCGAGCTGAACATGATAGCCGATAGAAATTTATCTTGGACCTCA 1500
L V L L S F V T V N S P L R G G R T F S D L N

TGACTACTGCTTCGGCAACCGGAATTCGAACACTGACCTCCACCGGCGACGCTCTCGGAGCTGTGGATTCAGAAATCGGGTCCACCGACGATCCGCGCT 1600
CACACCTCTAGA

2612

XbaI

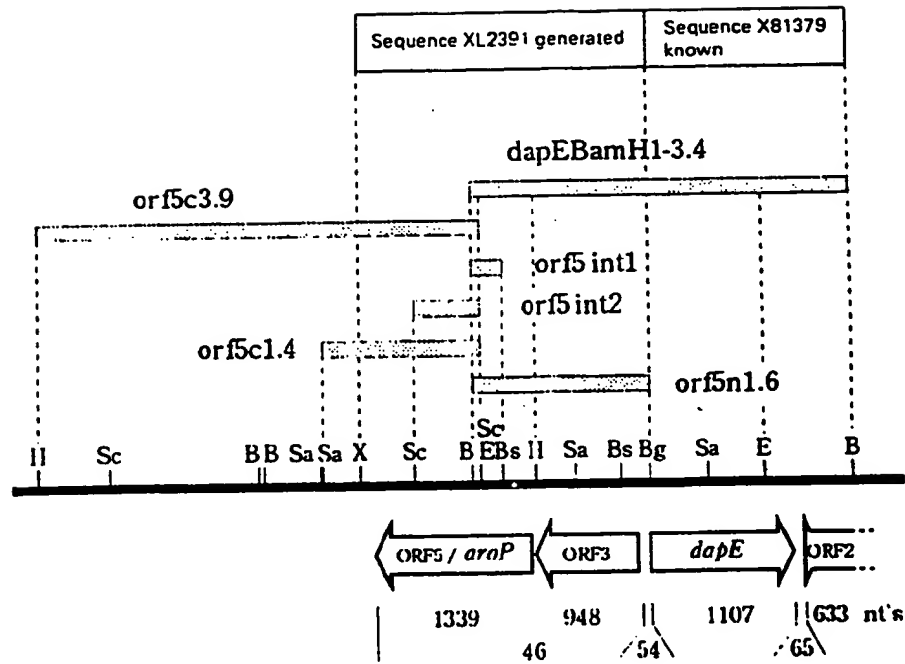
Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem ein für ein Protein zur Aufnahme einer Aminosäure kodierendes Transportgen aus einem Mikroorganismen-Stamm isoliert, kloniert und in eine, die entsprechende Aminosäure produzierende Wirtszelle transformiert wird, wonach nach Expression des Transportgens die Sekretionsrate der Aminosäure erhöht ist und die Wirtszelle einen erhöhten Anteil an Aminosäure ins Medium ausscheidet.
2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von aromatischen Aminosäuren.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Transportgen aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung *Corynebacterium* stammt.

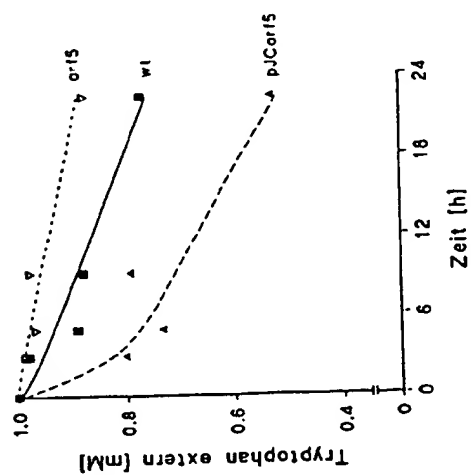
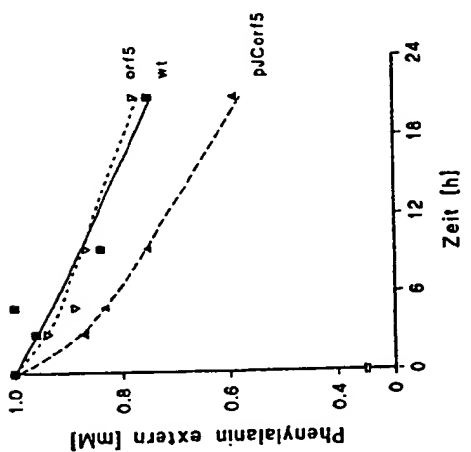
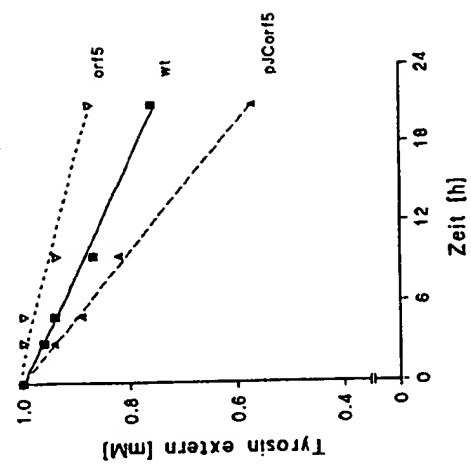
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtszelle für die Transformation ein Mikroorganismus aus der Gattung *Corynebacterium* eingesetzt wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtszelle für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtszelle für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der einen erhöhten Anteil an Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß für die Klonierung und Transformation des Transportgens ein Vektor mit niedriger Kopienzahl eingesetzt wird.
8. Transportgen gemäß Tabelle 1, wobei die Tabelle 1 Bestandteil dieses Anspruches ist, dadurch gekennzeichnet, daß das Transportgen in einer Genstruktur enthalten ist.
9. Vektor, enthaltend eine Genstruktur nach Anspruch 8.
10. Vektor nach Anspruch 9 mit niedriger Kopienzahl.
11. Transformierte Zelle, enthaltend eine Genstruktur nach Anspruch 8.
12. Transformierte Zelle, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 9 oder 10.
13. Transformierte Zelle nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Gattung *Corynebacterium* angehört.
14. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß in dieser die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme dereguliert sind.
15. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen erhöhten Anteil an Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

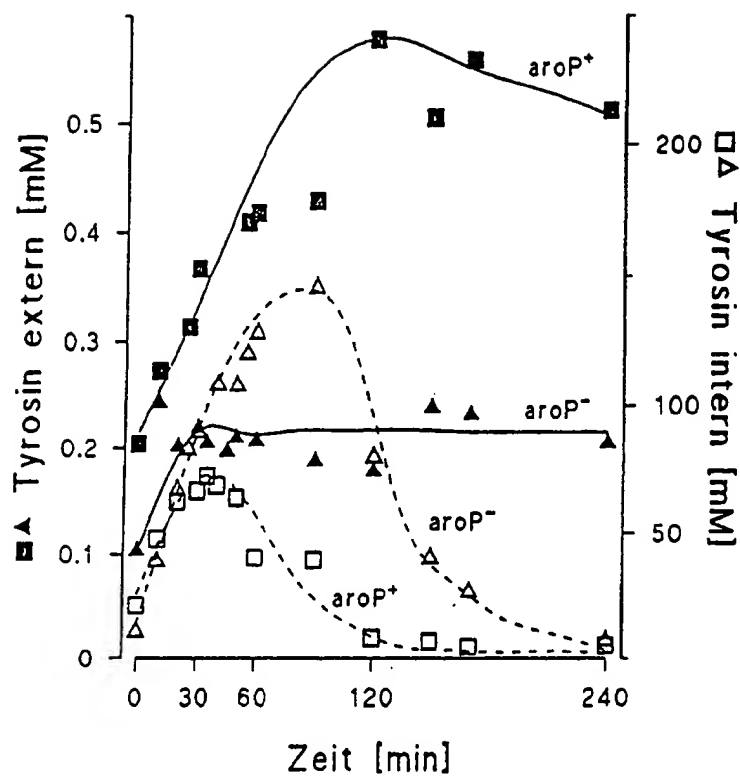
- Leerseite =



Figur 1



Figur 2



Figur 3